Oponentský posudek na diplomovou práci Bc. Anety Gandalovičové "The plasticity of melanoma cell invasiveness" v rámci magisterského studia na Přírodovědecké fakultě UK

Diplomová práce Bc. Anety Gandalovičové se zabývá mezenchymálními a ameboidními módy invazivity nádorových buněk a jejich přechody. Invazivita nádorových buněk je klíčovou vlastností těchto buněk k rozšíření buněk v organismu a metastázím, což je hlavní příčina úmrtí na nádorová onemocnění. Téma je to tudíž velmi aktuální s vysokým klinickým dopadem. Práce pak zkoumá a zavádí zkoumání invazivity buněk v 3D modelu a definuje vliv inhibitorů JAK/STAT dráhy a také NFκB dráhy na invazivitu melanomových buněk a dále se zabývá identifikací molekulárních drah, které se na těchto dějích podílí.

Formální kvalita předložené práce

Práce je po formální stránce dobře zpracována, je zde pár nepřesností, kdy například některé obrázky jsou citovány a jsou již na předchozí stránce (obr. 17), či je narušena posloupnost s jakou jsou obrázky uvedeny a např. je v textu uveden obr 17, poté odkaz na obr. 19. a 30. a až poté je odkaz na obr. 18.

Jazyk

Práce je psána v angličtině, a musím zde autorku velmi pochválit, neboť práce se četla dobře a nenašel jsem zde mnoho pravopisných či gramatických chyb.

Hodnocení jednotlivých částí diplomové práce

1) Literární úvod

V první části diplomové práce jsou vcelku zdařile shrnuty poznatky o molekulárních mechanismech a módech invazivity rakovinných buněk. Dle mého názoru je tato část zpracována velmi pečlivě a v rozumném rozsahu. Dle mého názoru by mohly být zahrnuty například i další dráhy ovlivňující invazivitu a metastatický potenciál buněk jako je třeba Wnt dráha.

2) Cíle práce

Cíle práce jsou jasně shrnuty do tří navazujících bodů, které si kladou za cíl optimalizovat přípravu 3D matric pro morfologické testy a mikroskopování buněk v reálném čase, připravit buněčné linie s modifikovanou aktivitou RhoA a dále ověřit nově identifikované kandidátní geny, které regulují ameboidně-mezenchymální (AMT) a mezenchymálně-ameboidní (MAT) přechody.

3) Metody

Metody zahrnují jednak přípravu 3D matric pro pozorování buněk, kultivaci a vlastní pozorování živých buněk v reálném čase a také molekulární klonování, vytváření stabilních buněčných linií a také klonování vybraných genů pomocí PCR. Práce tak má široký metodický záběr a je po metodické stránce velmi dobře popsána.

4) Výsledky

Ve výsledcích nalezneme úctyhodných 33 obrázků, což je podle mého názoru počet nadstandardní a zcela dostatečný k vyvození odpovídajících závěrů. Vlastní kvalita prezentovaných výsledků je velmi dobrá a svědčí o dobrém zvládnutí metod.

5) Diskuse

V diskusi autorka předkládá svou představu o úloze a charakteru invazivity u zkoumaných buněčných modelů. Ukazuje se, že indukovaná exprese RhoA buňky velmi rychle přeprogramuje na ameboidní typ invazivity a že tento fenotyp je výsledkem autokrinní/parakrinní signalizace zajištěné produkcí

prozánětlivých cytokinů jako je IL-6 a IL-1β, které jsou pravděpodobně spojeny s aktivací JAK/STAT a NFκB drah.

Další připomínky a otázky:

1) Třetí bod cílů práce je dle mého názoru definován velmi široce a sám o sobě by mohl být tématem diplomové práce. Připadá mi však, že autorka spíše popisuje nově nalezené geny a v práci se zabývá jejich klonováním a vytvořením stabilních linií, ale vlastní ověření co tyto regulátory dělají je v práci dokumentováno pouze za pomoci inhibitorů ruxolitinib a PS-1145. Nepovažuji to ale za nedostatek, neboť si myslím, že dat je v práci prezentováno hodně a jasně ukazují cílené úsilí a práci autorky.
2) Zajímala by mne role epigenetických regulací v řízení invazivity. Z předkládaných dat a faktu, že mnohé linie jsou schopny jak AMT, tak MAT, dle toho, jaký mód je pro ně výhodnější, lze předpokládat, že epigenetické změny zde mohou hrát důležitou úlohu. Je o úloze epigenetických změn něco známo?
3) Má další otázka směřuje na roli metabolismu a mitochondrií- je známo něco o korelaci invazivity buněk a produkci reaktivních kyslíkových radikálů a popřípadě funkci mitochondrií?
4) Inhibitory JAK/STAT a NFκB dráhy ruxolitinib a PS-1145 byly použity v koncentracích 10 μM ačkoli jejich IC50 hodnoty pro inhibici drah jsou okolo 100 nM. Proč byly použity tyto koncentrace a nemůžou tyto inhibitor v takových koncentracích vykazovat již nespecifické efekty, které nemusí nutně souviset s inhibicí zmíněných drah? Jak lze jednoduše vysvětlit rozdíl v účinnosti PS-1145 u buněk A375m2 a WM3629?

Celkové hodnocení diplomové práce

Práci hodnotím jako velmi zdařilou a zcela určitě ji doporučuji k obhajobě, autorka prokázala, že se orientuje ve vědecké literatuře, je schopna o dané problematice přemýšlet, provést vlastní experimenty a na jejich základě vyvodit závěry. Práce je psána velmi detailně a poctivě a já přeji autorce úspěšnou obhajobu a mnoho dalších úspěchů.

V Praze dne 27.5.2016 Mgr. Jaroslav Truksa Ph.D.